

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-067389
(43)Date of publication of application : 11.03.1997

(51)Int.Cl. C07H 15/04
C07H 1/02

(21)Application number : 07-245305 (71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD
(22)Date of filing : 30.08.1995 (72)Inventor : SHIODA MAKOTO
WATANABE KEIKO
HANAGATA GORO
TATSUMI KIYOSHI

(54) PRODUCTION OF LIPID CONTAINING SACCHARIDE**(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce a lipid, capable of readily providing a lipid containing saccharides in an aqueous system and useful as a raw material for medicines, foods and drinks, a surfactant or a biochemical reagent.

SOLUTION: A solution prepared by mixing a glucide with a lipid is heated to produce a lipid containing the glucide. A reducing sugar such as maltose or galactose is used as the glucide and a lipid containing a primary amine such as a lysosphingomyelin or phosphatidylethanolamine is used as the lipid. The thermal reaction of aqueous solutions of both is carried out at pH 4.5-7.5 and 90-100° C for several hr in the presence of an emulsifying agent and the lipid containing the saccharide is extracted from the reactional solution. The resultant extract is then concentrated and dried to afford the product.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The manufacturing method of the sugar content lipid characterized by heating the solution which mixed sugar and a lipid.

[Claim 2] The manufacturing method according to claim 1 which sugar is reducing sugar and is phospholipid in which a lipid contains a primary amine.

[Claim 3] The manufacturing method according to claim 1 or 2 whose sugar is at least one sort of reducing sugars chosen from the group which consists of a maltose, a galactose, and a lactose.

[Claim 4] The manufacturing method according to claim 1 to 3 which is phospholipid containing at least one sort of primary amines chosen from the group which a lipid becomes from lysosphingomyelin, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine.

[Claim 5] The manufacturing method according to claim 1 to 4 which heats the solution which mixed sugar and a lipid under existence of an emulsifier.

[Claim 6] The manufacturing method according to claim 5 using what has a hydrophilic property high as an emulsifier.

[Claim 7] The manufacturing method according to claim 5 using sucrose fatty acid ester and/or a sorbitan fatty acid ester as an emulsifier.

[Claim 8] It is heating of the solution which mixed sugar and a lipid pH 4.5-7.5 Manufacturing method according to claim 1 to 6 to perform.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the approach of manufacturing a sugar content lipid by using sugar and a lipid as a raw material. The sugar content lipid obtained by this invention is useful as a drugs raw material, an eating-and-drinking article raw material, a surfactant, or a reagent for biochemistry.

[0002]

[Description of the Prior Art] Phospholipid is main lipids which constitute the various membrane systems of the cell which constitutes a living thing, for example, plasmlemma, nuclear membrane, membrane of endoplasmic reticulum, mitochondrial membrane, the Golgi body film, the lysosome film, chloroplast membrane, a bacteria cell membrane, etc., it forms a lipid bilayer, protects the film and is maintaining the environment suitable for a proteinic functional manifestation. Moreover, it is also known that it is the reserve substance of the arachidonic acid in that phospholipid is bearing a role of sources of supply, such as a choline, Lynn, and a fatty acid, or a prostagladin biosynthesis. Furthermore, it is made gradually clear also about the accommodation function of the cell differentiation of phospholipid, and the phospholipid which discovers strong bioactive like a platelet activating factor (PAF) also exists. Thus, phospholipid has achieved various physiological functions in the living body, and it can be said that it is the important matter for a living body. In addition, this phospholipid is classified into glycerophospholipids, such as phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, and phosphatidylglycerol, and sphingophospholipid, such as sphingomyelin, according to that constituent.

[0003] On the other hand, although the glycolipid is also known as a constituent of a cell membrane, the glycolipid exists in the cell membrane outside surface, and since it has the manifestation pattern of the sugar chain which changes with the versatility of the sugar chain, and classes of cell, it is thought that it is functioning also as a surface marker of a cell. Moreover, the cell which specialized has discovered the specific glycolipid to cell surface. And this suggests that the glycolipid has various cell functions, such as a function as an acceptor, activity accommodation of membrane enzyme, and accommodation of cell differentiation. This glycolipid is the generic name of the matter which contains both water-soluble sugar chain and lipophilicity radical in intramolecular. And the glycero mold glycolipid which is a SUFINGO mold glycolipid in which most has long chain bases, such as sphingosine, in an animal cell, and has diacylglycerol, alkyl acyl glycerol, alkenyl acyl glycerol, etc. was [only being found out in vegetation, bacteria, etc., and]. However, it becomes clear that seminolipid exists in the Buta testis in recent years, and it is thought that the glycero mold glycolipid has a certain physiological function also in an animal cell.

[0004] And in the relation of phospholipid and sugar, it is clear to have played the role of the support (GPI support) with which phosphatidylinositol combines with protein through the inositol joint sugar chain of intramolecular, and ties protein with a cell membrane. Having performed structural analysis is reported [acetylcholinesterase / the Trypanosoma membrane antigen, / human erythrocyte] about this GPI support. In addition, it is known that a film front face will be movable and the protein tied of GPI support is considered that GPI support is controlling the operation like an enzyme, and the function as an acceptor.

[0005] Since it becomes intramolecular from the hydrophobic sections, such as fatty-acid residue, and the hydrophilic sections, such as a phosphoric-acid radical and sugar residue, and has a parents intermediaion-property from the description on this structure, conjugated lipid mentioned above, such as phospholipid and a glycolipid, is conventionally used as an emulsifier. Especially the low purity lecithin (phosphatidylcholine) that can be obtained from an soybean or the yolk is widely used as the emulsifier and dispersant of a food grade, although

it is the mixture of various phospholipid.

[0006] Moreover, conjugated lipid is used for the drug delivery system. This drug delivery system is the approach of enclosing various physiologic compounds, an enzyme, hormone, a gene, etc. into liposome, and making it send a specific organ. And the parents intermedium-property of conjugated lipid can be used as a liposome raw material, and it is in the present condition that research is done so that it may find out the stable liposome using conjugated lipid, the liposome which has a function. Furthermore, the attempt which uses a phospholipid derivative as a liposome material is made. In addition, it is thought that preparing a more functional liposome material brings big progress to research of a drug delivery system.

[0007] Stars showed clearly that the sugar phospholipid which the disaccharide combined with the phosphatidylethanolamine of the cow's milk origin exists, decided the structure by structural analysis by chemical analysis and instrumental analysis, and announced this at the lipid biochemistry meeting in June, 1994. Although this sugar phospholipid is found out of cow's milk, it exists only in a minute amount extremely in cow's milk (53 mg/kg and cow's milk solid). Moreover, although acquisition is possible, if yield is bad and takes a cost side etc. into consideration according to known glycolipid purification methods, such as a silica gel column chromatography, the use as a food-grade emulsifier etc. is difficult.

[0008] In addition, pH, temperature, and time amount are made into specific conditions, and are heat-treated, amino acid, a peptide, and the amino group and reducing sugar of a protein lysine are combined by the approach called an amino-carbonyl reaction or GURIKESHON, and the attempt used for the application of an anti-oxidant etc. is known. [Provisional-Publication-No. 56 No. -166286 official report]. Furthermore, although the reaction of the lipid and sugar which have an amino group was also reported, since the lipid was water-insoluble nature, it had to be made to react in organic solvents, such as chloroform, and when using as materials, such as an eating-and-drinking article and cosmetics, was considered, the establishment of an approach which manufactures the lipid which contains sugar easily in a drainage system was usually called for.

[0009]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] When this invention persons were advancing research wholeheartedly so that they may establish the approach that the lipid which contains sugar easily in a drainage system can be manufactured, in view of the present condition mentioned above, they came to complete a header and this invention for the ability of the lipid containing sugar to be manufactured by heating the solution which mixed sugar and a lipid. Therefore, this invention makes it a technical problem to offer the approach of manufacturing a sugar content lipid by using sugar and a lipid as a raw material. The sugar content lipid manufactured by the approach of this invention can be widely used as food additives, such as an emulsifier, or physiologic and a cosmetics material.

[0010]

[Means for Solving the Problem] It is the approach of manufacturing a sugar content lipid, by heating the solution which mixed sugar and a lipid in this invention. As sugar which can be used by this invention, a sialyl lactose, an oligosaccharide connective, etc. can be illustrated to reducing sugars, such as a glucose, a fructose, a maltose, a galactose, and a lactose, and a pan. Moreover, as a lipid which can be used by this invention, the phospholipid containing primary amines, such as lysosphingomyelin, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, lysophosphatidylethanolamine, and lysophosphatidylserine, can be illustrated.

[0011] It may face manufacturing a sugar content lipid by this invention, sugar and a lipid may be heated underwater, and sugar and a lipid may be heated in an organic solvent. In addition, if the applications of the manufactured sugar content lipid are a reagent, physiologic, etc., since the direction which heated and manufactured sugar and a lipid in the organic solvent can raise reaction effectiveness, it is desirable. Moreover, if the application of the manufactured sugar content lipid is a food additive etc., sugar and a lipid will be heated and manufactured underwater, but since hydrophobicity is high, if a lipid is independent, it is hard to distribute it underwater. Therefore, when heating sugar and a lipid underwater and manufacturing a sugar content lipid, before heating, it is desirable to add the high emulsifier of whenever [hydrophilic-properties /, such as an emulsifier accepted as food additives, such as sucrose fatty acid ester, a glycerine fatty acid ester, a sorbitan fatty acid ester propylene glycol fatty acid ester, and lecithin, and polyoxyethylene fatty acid ester, polyethylene alkyl ether,], and to distribute a lipid underwater. What is necessary is just to usually make whenever [stoving temperature] into 50-200 **, although it changes with stability of the sugar to be used and phospholipid. If whenever [stoving temperature] is lower than 50 degrees C, manufacture of a sugar content lipid will take time amount, and if 200 ** is exceeded, by-products, such as a decomposition product, will increase.

[0012] Furthermore, since it faces manufacturing a sugar content lipid, generation of a by-product is controlled

and yield improves, it is pH with the buffer solutions, such as the acetic-acid buffer solution. 4.5–7.5 Maintaining and manufacturing is desirable. If acidity is strong, while the rate of the condensation reaction itself will become slow on the occasion of manufacture, when using the sugar containing especially the sugar chain more than a disaccharide as a raw material, there is a danger that association between sugar chains will cut. Thus, the obtained sugar content lipid extracts a lipid fraction from pyrogenetic reaction liquid, carries out concentration hardening by drying of the extract, and uses it as a product. Furthermore, when you need purification for altitude, it is desirable to refine using the means usually used for purification of lipids, such as ion exchange chromatography.

[0013] Thus, since it has a hydrophilic part and a hydrophobic part and has a parents intermediaion–property, the manufactured sugar content lipid can be used as a surfactant, an emulsifier, etc. Since a sugar content lipid can be especially manufactured with regards to the chain length and the class of sugar that there is nothing, it is possible to choose an HLB value freely and it is possible to manufacture the emulsifier set by the purposes of use, such as an O/W emulsifier. Moreover, the sugar content lipid manufactured by doing in this way can also be used as a liposome raw material. It is possible by detaching and attaching the fatty acid of arbitration especially to prepare liposome with the property of arbitration. Furthermore, it is possible to combine with a glycerophospholipid etc. the sialic-acid content sugar said to play the very important role in in the living body, and it is useful also when investigating a strange physiological function.

[0014] In addition, although the sugar content lipid manufactured by doing in this way is completely satisfactory in respect of safety, and it can add for food, physic, cosmetics, etc. as it is and can be used for the target application, when you need a sugar content lipid with still higher purity, it is possible to refine easily with the column chromatography in a normal phase.

[0015]

[Embodiment of the Invention] An example is shown below and this approach is concretely explained to it.

[Example 1] After having mixed and ultrasonicated sorbitan monolaurate 2mg with the silica gel column in 2ml (pH 6.5) of 0.2-N phosphate buffer solutions as lysosphingomyelin 1mg refined to 95% of purity, galactose 3mg, and an emulsifier after hydrolyzing the sphingomyelin of the cow's milk origin with 2-N hydrochloric acid, and obtaining stable dispersion liquid, these dispersion liquid were heated at 90 degrees C for 5 hours. After heating, 2ml of chloroform:methanol (1:1) mixed liquor was added to dispersion liquid, the lipid fraction was extracted, and concentration hardening by drying was carried out. And a chloroform:methanol: When the thin-layer chromatography (normal phase) which used water (60:40:8) as the expansion solvent was performed, existence of the matter which shows a positive reaction at coincidence to the location where lysosphingomyelin differs from mobility with a Dittmer–Lester reagent and an orcinol reagent was checked. Therefore, this matter was judged to be galactose content phospholipid. In addition, the Dittmer–Lester coloring densitometry method (new chemistry experiment lecture 4 lipid II the 48th page) When the quantum was carried out, it is galactose content phospholipid. It turned out that 0.6mg is generating.

[0016]

[The example 1 of a comparison] After mixing and ultrasonicating sphingomyelin 1mg, galactose 3mg, and sorbitan monolaurate 2mg of the cow's milk origin in 2ml (pH 6.5) of 0.2-N phosphate buffer solutions and obtaining stable dispersion liquid, these dispersion liquid were heated at 90 degrees C for 5 hours. When the thin-layer chromatography (normal phase) which used chloroform:methanol:water (60:40:8) as the expansion solvent was performed about the matter which exists after heating and in dispersion liquid, existence of the matter which shows a positive reaction to coincidence with a Dittmer–Lester reagent and an orcinol reagent was not checked.

[0017]

[Example 2] This suspension after mixing and ultrasonicating maltose 20mg and phosphatidylethanolamine 5mg in 5ml of water and obtaining suspension It heated at 100 degrees C for 9 hours. After heating, 5ml of chloroform:methanol (1:1) mixed liquor was added to suspension, the lipid fraction was extracted, and concentration hardening by drying was carried out. And a chloroform:methanol: Thin-layer chromatography which used water (65:40:8) as the expansion solvent (normal phase) When carried out, existence of the matter which shows a positive reaction at coincidence to the location where mobility is lower than phosphatidylethanolamine with a Dittmer–Lester reagent and an orcinol reagent was checked. Therefore, this matter was judged to be maltose content phospholipid. In addition, when the quantum was carried out by the Dittmer–Lester coloring densitometry method, it is maltose content phospholipid. It turned out that 2.7mg is generating. Moreover, a change of the amount of generation of the maltose content phospholipid manufactured by the approach of this

example with time is shown in drawing 1 R> 1.

[0018]

[Example 3] It is 0.5mg (DK ester F-90, Dai-Ichi Kogyo Seiyaku make) of sucrose fatty acid ester as maltose 20mg, phosphatidylethanolamine 5mg, and an emulsifier. These dispersion liquid after mixing and ultrasonication in 5ml of water and obtaining stable dispersion liquid It heated at 100 degrees C for 9 hours. After heating, 5ml of chloroform:methanol (1:1) mixed liquor was added to dispersion liquid, the lipid fraction was extracted, and concentration hardening by drying was carried out. And a chloroform:methanol: Thin-layer chromatography which used water (65:40:8) as the expansion solvent (normal phase) When carried out, existence of the matter which shows a positive reaction at coincidence to the location where mobility is lower than phosphatidylethanolamine with a Dittmer-Lester reagent and an orcinol reagent was checked. Therefore, this matter was judged to be maltose content phospholipid. In addition, when the quantum was carried out by the Dittmer-Lester coloring densitometry method, it is maltose content phospholipid. It turned out that 4.1mg is generating. Moreover, a change of the amount of generation of the maltose content phospholipid manufactured by the approach of this example with time is shown in drawing 2 . When heating sugar and a lipid underwater and manufacturing a sugar content lipid from an example 2 and an example 3, it turns out that there is [a direction which added the emulsifier] much yield.

[0019]

[Example 4] It is 0.5mg (DK ester F-90, Dai-Ichi Kogyo Seiyaku make) of sucrose fatty acid ester as maltose 20mg, phosphatidylethanolamine 5mg, and an emulsifier. These dispersion liquid after mixing and ultrasonication in 5ml of water and obtaining stable dispersion liquid It heated at 100 degrees C for 9 hours. After heating, 5ml of chloroform:methanol (1:1) mixed liquor was added to dispersion liquid, the lipid fraction was extracted, and concentration hardening by drying was carried out. And a chloroform:methanol: Thin-layer chromatography which used water (65:40:8) as the expansion solvent (normal phase) When carried out, existence of the matter which shows a positive reaction at coincidence to the location where mobility is lower than phosphatidylethanolamine with a Dittmer-Lester reagent and an orcinol reagent was checked. Therefore, this matter was judged to be lactose content phospholipid.

[0020]

[Example 5] It is 0.5mg (DK ester F-90, Dai-Ichi Kogyo Seiyaku make) of sucrose fatty acid ester as maltose 20mg, phosphatidylserine 5mg, and an emulsifier. These dispersion liquid after mixing and ultrasonication in 5ml of water and obtaining stable dispersion liquid It heated at 100 degrees C for 9 hours. After heating, 5ml of chloroform:methanol (1:1) mixed liquor was added to dispersion liquid, the lipid fraction was extracted, and concentration hardening by drying was carried out. And a chloroform:methanol: Thin-layer chromatography which used water (65:40:8) as the expansion solvent (normal phase) When carried out, existence of the matter which shows a positive reaction at coincidence to the location where mobility is lower than phosphatidylserine with a Dittmer-Lester reagent and an orcinol reagent was checked. Therefore, this matter was judged to be maltose content phospholipid.

[0021]

[The example 2 of a comparison] It is 0.5mg (DK ester F-90, Dai-Ichi Kogyo Seiyaku make) of sucrose fatty acid ester as maltose 20mg, phosphatidylcholine 5mg, and an emulsifier. These dispersion liquid after mixing and ultrasonication in 5ml of water and obtaining stable dispersion liquid It heated at 100 degrees C for 9 hours. After heating, 5ml of chloroform:methanol (1:1) mixed liquor was added to dispersion liquid, the lipid fraction was extracted, and concentration hardening by drying was carried out. And a chloroform:methanol: Thin-layer chromatography which used water (65:40:8) as the expansion solvent (normal phase) When carried out, existence of the matter which shows a positive reaction to coincidence with a Dittmer-Lester reagent and an orcinol reagent was not checked. As a lipid used as a raw material, phospholipid, such as lysosphingomyelin which has a primary amine in intramolecular, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, lysophosphatidylethanolamine, and a RIBOHOSUFACHIJIRU serine, is desirable, and examples 1-5 and the examples 1-2 of a comparison show that the phospholipid which does not have a primary amine in intramolecular, such as sphingomyelin and phosphatidylcholine, is not desirable.

[0022]

[Example 6] It is 0.5mg (DK ester F-90, Dai-Ichi Kogyo Seiyaku make) of sucrose fatty acid ester as maltose 20mg, phosphatidylethanolamine 5mg, and an emulsifier. The broader-based buffer solution of Britton-Robinson which consists of a phosphoric acid, an acetic acid, and a boric-acid mixed liquor-sodium hydroxide (pH 3-8) After mixing and ultrasonication in 5ml and obtaining stable dispersion liquid, these dispersion liquid were heated

at 100 degrees C for 9 hours. After heating, 5ml of chloroform:methanol (1:1) mixed liquor was added to dispersion liquid, the lipid fraction was extracted, and concentration hardening by drying was carried out. And a chloroform:methanol: The silica gel column chromatography which used water (65:40:8) as the elution solvent recovered maltose content phospholipid, and the yield of the maltose content phospholipid by the difference in pH was investigated. The result is shown in drawing 3 . Consequently, maltose content phospholipid is pH 4.5-7.5. The high yield was shown.

[0023]

[Example 7] After mixing sorbitan monolaurate 0.5g in 2l. (pH 6) of acetic-acid buffer solutions as 1g [of phospholipid concentrates of the cow's milk origin], and galactose 4g, and an emulsifier, it heated at 80 degrees C for 11 hours. After heating, 2l. of chloroform:methanol (1:1) mixed liquor was added to dispersion liquid, the lipid fraction was extracted, and concentration hardening by drying was carried out. And a chloroform:methanol: Thin-layer chromatography which used water (65:40:8) as the expansion solvent (normal phase) When carried out, generation of galactose content phospholipid has been checked. In addition, when the quantum was carried out by the Dittmer-Lester coloring densitometry method, it turned out that 0.4g of lipid mixture containing galactose content phospholipid is generating.

[0024]

[Example 8] Maltose 20mg, phosphatidylethanolamine 5mg, and 0.5mg of emulsifiers These dispersion liquid after mixing and ultrasonication in 5ml of water and obtaining stable dispersion liquid It heated at 100 degrees C for 10 hours. In addition, as an emulsifier, it is sucrose fatty acid ester from which whenever [esterification] differs. (DK ester F-160, F-90, F-70, Dai-Ichi Kogyo Seiyaku make) It was used. After heating, 5ml of chloroform:methanol (1:1) mixed liquor was added to dispersion liquid, the lipid fraction was extracted, and concentration hardening by drying was carried out. And a chloroform:methanol: The silica gel column chromatography which used water (65:40:8) as the elution solvent recovered maltose content phospholipid, and the yield of the maltose content phospholipid by the difference of whenever [esterification] was investigated. The result is shown in Table 1. Even if whenever [esterification / of sucrose fatty acid ester] is different, it turns out that reaction effectiveness does not change a lot. Therefore, all can be used if it is the high emulsifier of whenever [hydrophilic].

[0025]

[Table 1]

Class of ----- emulsifier Whenever [esterification] Yield (%)
----- F-160 1.21 82.0 F-90 1.53 81.6 F-70 1.60 81.1-----

[0026]

[Effect of the Invention] According to this invention, a sugar content lipid can be easily manufactured by heating sugar and a lipid. Thus, since the manufactured sugar content lipid has a parents intermedium-property, it is useful as food additives, such as a surfactant and an emulsifier, or physic and a cosmetics material.

[Translation done.]

*NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] A change of the amount of generation of the maltose content phospholipid in an example 2 with time is shown. The inside of drawing and PE are L-GPL about phosphatidylethanolamine. Maltose content phospholipid is shown.

[Drawing 2] A change of the amount of generation of the maltose content phospholipid in an example 3 with time is shown. The inside of drawing and PE are L-GPL about phosphatidylethanolamine. Maltose content phospholipid is shown.

[Drawing 3] The yield of the maltose content phospholipid by the difference in pH in an example 6 is shown.

[Translation done.]

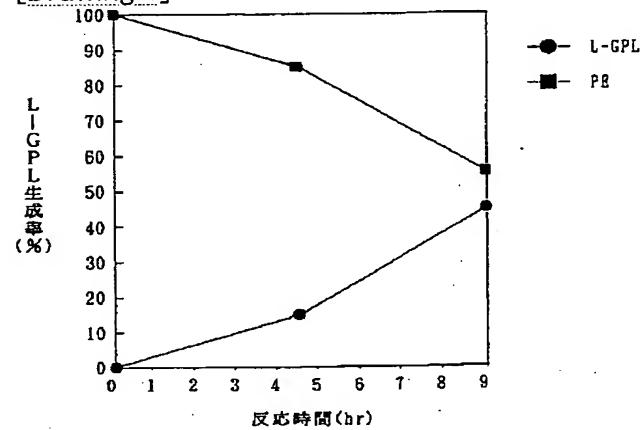
NOTICES

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

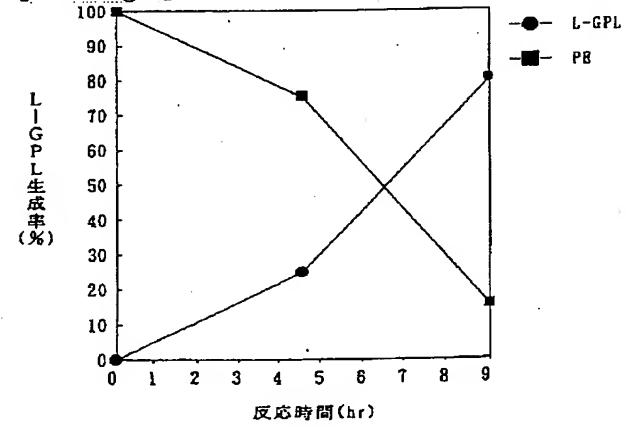
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

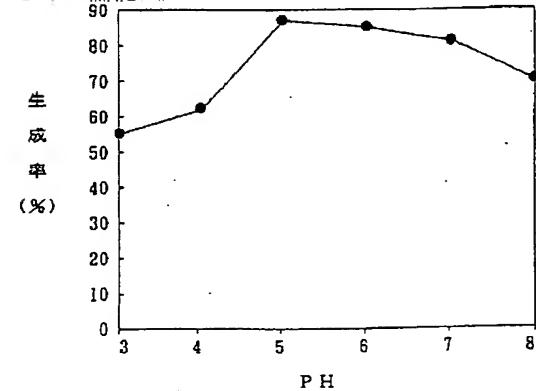
[Drawing 1]



[Drawing 2]



[Drawing 3]



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-67389

(43)公開日 平成9年(1997)3月11日

(51) Int.Cl.⁶
C 0 7 H 15/04
1/02

識別記号 廣内整理番号

F I
C 0 7 H 15/04
1/02

技術表示箇所

Z

審査請求 未請求 請求項の数8 FD (全6頁)

(21)出願番号 特願平7-245305

(22)出願日 平成7年(1995)8月30日

(71)出願人 000006699
雪印乳業株式会社
北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
(72)発明者 塩田 誠
埼玉県川越市新宿町5-11-3
(72)発明者 渡辺 啓子
埼玉県所沢市旭町16-10-305
(72)発明者 花形 吾朗
埼玉県狭山市富士見2-18-17
(72)発明者 異 清
埼玉県入間市大字野田982-2
(74)代理人 弁理士 藤野 清也 (外1名)

(54)【発明の名称】 糖含有脂質の製造法

(57)【要約】

【解決手段】 糖質と脂質とを混合した溶液を加熱して糖含有脂質を製造する方法。糖質には、マルトース、ガラクトース等の還元糖が、脂質にはリゾスフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン等の第1級アミン含有リン脂質が用いられる。加熱反応は、両者の水溶液を乳化剤の存在下pH 4.5~7.5で90~100 °Cで数時間行ない、反応液から糖含有脂質を抽出し、これを濃縮乾燥して製品とする。

【効果】 水系において、容易に糖含有脂質を得ることができ、医薬、飲食品の原料、界面活性剤あるいは生化学用試薬として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖質と脂質を混合した溶液を加熱することを特徴とする糖含有脂質の製造法。

【請求項2】 糖質が還元糖であり、脂質が第一級アミンを含有するリン脂質である請求項1記載の製造法。

【請求項3】 糖質が、マルトース、ガラクトース及びラクトースよりなる群から選択される少なくとも1種の還元糖である請求項1又は2に記載の製造法。

【請求項4】 脂質が、リソスフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジルセリンよりなる群から選択される少なくとも1種の第一級アミンを含有するリン脂質である請求項1乃至3のいずれかに記載の製造法。

【請求項5】 糖質と脂質を混合した溶液を乳化剤の存在下で加熱する請求項1乃至4のいずれかに記載の製造法。

【請求項6】 乳化剤として親水性の高いものを用いる請求項5記載の製造法。

【請求項7】 乳化剤としてショ糖脂肪酸エステル及び／又はソルビタン脂肪酸エステルを用いる請求項5記載の製造法。

【請求項8】 糖質と脂質を混合した溶液の加熱をpH 4.5～7.5で行なう請求項1乃至6のいずれかに記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、糖質と脂質を原料として糖含有脂質を製造する方法に関する。本発明により得られる糖含有脂質は、医薬品原料、飲食品原料、界面活性剤、あるいは、生化学用試薬などとして有用である。

【0002】

【従来の技術】リン脂質は、生物を構成する細胞の種々の膜系、例えば、原形質膜、核膜、小胞体膜、ミトコンドリア膜、ゴルジ体膜、リソソーム膜、葉緑体膜、細菌細胞膜などを構成する主要な脂質であり、脂質二重層を形成して膜を保護し、タンパク質などの機能発現に適した環境を維持している。また、リン脂質は、コリン、リン、脂肪酸などの供給源としての役割を担っていることやプロスタグラジン生合成におけるアラキドン酸の貯蔵物質であることも知られている。さらに、リン脂質の細胞分化の調節機能についても徐々に明らかにされつつあり、血小板活性化因子（PAF）のように強い生理活性を発現するリン脂質も存在している。このように、リン脂質は生体内で種々の生理的機能を果たしており、生体にとって重要な物質であるといえる。なお、このリン脂質は、その構成成分により、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロールなどのグリセロリン脂質とスフィンゴミエリン

などのスフィンゴリン脂質に分類されている。

【0003】一方、糖脂質も細胞膜の構成成分として知られているが、糖脂質は、細胞膜外表面に存在しており、その糖鎖の多様性と細胞の種類により異なる糖鎖の発現パターンを有することから、細胞の表面マーカーとしても機能していると考えられている。また、分化した細胞は、特定の糖脂質を細胞表面に発現している。そしてこのことは、糖脂質が受容体としての機能、膜酵素の活性調節、細胞分化の調節など様々な細胞機能を有していることを示唆するものである。この糖脂質は、分子内に水溶性糖鎖と脂溶性基の両者を含む物質の総称である。そして、動物細胞においては殆どがスフィンゴシンなどの長鎖塩基を有するスフィンゴ型糖脂質であり、ジアシルグリセロール、アルキルアシルグリセロール、アルケニルアシルグリセロールなどを有するグリセロ型糖脂質は植物や細菌などにおいて見出されているのみであった。しかし、近年、ブタ精巣にセミノリビドが存在することが明らかとなり、動物細胞においてもグリセロ型糖脂質が何らかの生理機能を有しているものと考えられている。

【0004】そして、リン脂質と糖との関連においては、ホスファチジルイノシトールが分子内のイノシトール結合糖鎖を介してタンパク質と結合し、タンパク質を細胞膜につなぎ止めるアンカー（GPIアンカー）の役割を果たしていることが明らかとなっている。このGPIアンカーについては、トリパノゾーマ膜抗原、ヒト赤血球アセチルコリンエ斯特ラーゼなどについて構造解析を行ったことが報告されている。なお、GPIアンカーでつなぎ止められたタンパク質は膜表面を移動することができることが知られており、GPIアンカーは酵素的な作用や受容体としての機能を制御しているものと考えられている。

【0005】上述したリン脂質や糖脂質などの複合脂質は、分子内に脂肪酸残基などの疎水性部とリン酸基や糖残基などの親水性部からなり、この構造上の特徴から両親媒的な性質を有するので、従来より乳化剤として利用されている。特に、大豆や卵黄から得ることができる低純度レシチン（ホスファチジルコリン）は、各種リン脂質の混合物であるが、食品用の乳化剤や分散剤として広く利用されている。

【0006】また、複合脂質は薬物送達システムに利用されている。この薬物送達システムとは、リポソーム中に種々の医薬化合物、酵素、ホルモン、遺伝子などを封入し特定臓器に送達させる方法である。そして、複合脂質の両親媒的な性質は、リポソーム原料として利用が可能であり、複合脂質を用いた安定なリポソームや機能を有するリポソームなどを見出すべく、研究が行われている現状にある。さらには、リン脂質誘導体をリポソーム素材として利用する試みがなされている。なお、より機能的なリポソーム素材を調製することは、薬物送達シ

テムの研究に大きな進展をもたらすものと考えられている。

【0007】花形らは、牛乳由来のホスファチジルエタノールアミンに二糖が結合した糖リン脂質が存在することを明らかにし、化学的な分析及び機器分析による構造解析によりその構造を確定して、このことを1994年6月の脂質生化学会において発表した。この糖リン脂質は、牛乳中から見出されたものであるが、牛乳中には極めて微量にしか存在しない(53mg/kg・牛乳固形)。また、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなど既知の糖脂質精製法により取得は可能であるが、収率が悪く、コスト面などを考慮すると食品用乳化剤などとしての利用は困難である。

【0008】なお、pH、温度及び時間を特定条件にして加熱処理し、アミノ酸、ペプチド、タンパク質リジンのアミノ基と還元糖とをアミノカルボニル反応又はグリケーションと呼ばれる方法により結合させ、抗酸化剤などの用途に利用する試みが知られている【特開昭56-166286号公報】。さらに、アミノ基を有する脂質と糖との反応についても報告されているが、通常、脂質は水不溶性であるのでクロロホルムなどの有機溶媒中で反応させなければならず、飲食品や化粧品などの素材として利用することを考えた場合、水系において容易に糖を含有する脂質を製造する方法の確立が求められていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上述した現状を鑑み、水系において容易に糖を含有する脂質を製造することができる方法を確立するべく、鋭意研究を進めていたところ、糖質と脂質を混合した溶液を加熱することにより、糖を含有する脂質を製造することができるを見出し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明は、糖質及び脂質を原料として、糖含有脂質を製造する方法を提供することを課題とする。本発明の方法により製造された糖含有脂質は、乳化剤などの食品添加物として、あるいは、医薬、化粧品素材として、広く利用することが可能である。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明では、糖質と脂質を混合した溶液を加熱することにより糖含有脂質を製造する方法である。本発明で使用することができる糖質としては、グルコース、フルクトース、マルトース、ガラクトース、ラクトースなどの還元糖、さらには、シアリルラクトースやオリゴ糖結合物などを例示することができる。また、本発明で使用することができる脂質としては、リゾスフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルセリンなどの第一級アミンを含有するリン脂質を例示することができる。

【0011】

本発明で糖含有脂質を製造するに際して

は、水中で糖質と脂質を加熱しても良いし、有機溶媒中で糖質と脂質を加熱しても良い。なお、製造した糖含有脂質の用途が試薬や医薬などであれば、有機溶媒中で糖質と脂質を加熱して製造した方が反応効率を高めることができるので好ましい。また、製造した糖含有脂質の用途が食品添加物などであれば、水中で糖質と脂質を加熱して製造することになるが、脂質は疎水性が高いので単独では水中に分散し難い。したがって、水中で糖質と脂質を加熱して糖含有脂質を製造する場合には、加熱する前にショ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、レシチンなどの食品添加剤として認められている乳化剤やポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリエチレンアルキルエーテルなどの親水性度の高い乳化剤を添加して脂質を水中に分散させることが望ましい。加熱温度は、使用する糖質及びリン脂質の安定性により異なるが、通常50~200℃とすれば良い。加熱温度が50℃より低いと糖含有脂質の製造に時間を要し、また、200℃を越えると分解物などの副生成物が多くなる。

【0012】さらに、糖含有脂質を製造するに際しては、副生成物の生成が抑制されて収率が向上するので、酢酸緩衝液などの緩衝液でpHを4.5~7.5に維持して製造することが望ましい。製造に際して酸性度が強いと縮合反応自体の速度が遅くなると共に、特に二糖以上の糖鎖を含有する糖質を原料として使用する場合、糖鎖間の結合が切断する危険性がある。このようにして得られた糖含有脂質は、加熱反応液から脂質画分を抽出し、抽出物を濃縮乾固して製品とする。また、さらに高度に精製を必要とする場合には、イオン交換クロマトグラフィーなど脂質の精製に通常用いられる手段を用いて精製することが好ましい。

【0013】このようにして製造された糖含有脂質は、親水性部分と疎水性部分を併せ持ち両親媒的な性質を有するので、界面活性剤や乳化剤などとして利用することができる。特に、糖質の鎖長や種類に関係なく糖含有脂質を製造することができるので、HLB値を自由に選択することができ、O/W乳化剤など使用目的に合わせた乳化剤を製造することが可能である。また、このようにして製造された糖含有脂質は、リポソーム原料として利用することもできる。特に、任意の脂肪酸を着脱することにより、任意の特性を持つリポソームを調製することができる。さらには、生体内において極めて重要な役割を演じているといわれているシアル酸含有脂質をグリセロリン脂質などと結合させることができ、未知の生理機能を探究する上でも有用である。

【0014】なお、このようにして製造された糖含有脂質は、安全性という点で全く問題が無く、そのまま、食品や医薬、化粧品などに添加して目的の用途に使用することができるが、さらに純度の高い糖含有脂質を必要と

する場合は、順相でのカラムクロマトグラフィーにより、容易に精製することが可能である。

【0015】

【発明の実施の形態】以下に実施例を示して、本方法を具体的に説明する。

【実施例1】牛乳由来のスフィンゴミエリンを2N塩酸で加水分解した後、シリカゲルカラムで純度95%まで精製したリゾスフィンゴミエリン1mg、ガラクトース3mg及び乳化剤としてソルビタンモノラウレート2mgを0.2Nリン酸緩衝液(pH 6.5)2ml中で混合し、超音波処理して安定な分散液を得た後、この分散液を90°Cで5時間加熱した。加熱後、分散液にクロロホルム：メタノール(1:1)混合液2mlを加えて脂質画分を抽出し、濃縮乾固した。そして、クロロホルム：メタノール：水(60:40:8)を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー(順相)を行ったところ、リゾスフィンゴミエリンと移動度が異なる位置に、Dittmer-Lester試薬及びオルシノール試薬で陽性反応を同時に示す物質の存在が確認された。従って、この物質をガラクトース含有リン脂質と判断した。なお、Dittmer-Lester発色デンシトメトリ法(新生化学実験講座4 脂質II 第48頁)により定量したところ、ガラクトース含有リン脂質 0.6mgが生成していることが判った。

【0016】

【比較例1】牛乳由来のスフィンゴミエリン1mg、ガラクトース3mg及びソルビタンモノラウレート2mgを0.2Nリン酸緩衝液(pH 6.5)2ml中で混合し、超音波処理して安定な分散液を得た後、この分散液を90°Cで5時間加熱した。加熱後、分散液中に存在する物質について、クロロホルム：メタノール：水(60:40:8)を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー(順相)を行ったところ、Dittmer-Lester試薬及びオルシノール試薬で陽性反応を同時に示す物質の存在は確認されなかった。

【0017】

【実施例2】マルトース20mg及びホスファチジルエタノールアミン5mgを水5ml中で混合し、超音波処理して懸濁液を得た後、この懸濁液を100°Cで9時間加熱した。加熱後、懸濁液にクロロホルム：メタノール(1:1)混合液5mlを加えて脂質画分を抽出し、濃縮乾固した。そして、クロロホルム：メタノール：水(65:40:8)を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー(順相)を行ったところ、ホスファチジルエタノールアミンよりも移動度の低い位置に、Dittmer-Lester試薬及びオルシノール試薬で陽性反応を同時に示す物質の存在が確認された。従って、この物質をマルトース含有リン脂質と判断した。なお、Dittmer-Lester発色デンシトメトリ法により定量したところ、マルトース含有リン脂質 2.7mgが生成していることが判った。また、本実施例の方法で製造したマルトース含有リン脂質の生成量の経時的变化を図1に示す。

【0018】

【実施例3】マルトース20mg、ホスファチジルエタノールアミン5mg及び乳化剤としてショ糖脂肪酸エステル(DKエステルF-90、第一工業製薬製)0.5mgを水5ml中で混合し、超音波処理して安定な分散液を得た後、この分散液を100°Cで9時間加熱した。加熱後、分散液にクロロホルム：メタノール(1:1)混合液5mlを加えて脂質画分を抽出し、濃縮乾固した。そして、クロロホルム：メタノール：水(65:40:8)を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー(順相)を行ったところ、ホスファチジルエタノールアミンよりも移動度の低い位置に、Dittmer-Lester試薬及びオルシノール試薬で陽性反応を同時に示す物質の存在が確認された。従って、この物質をマルトース含有リン脂質と判断した。なお、Dittmer-Lester発色デンシトメトリ法により定量したところ、マルトース含有リン脂質 4.1mgが生成していることが判った。また、本実施例の方法で製造したマルトース含有リン脂質の生成量の経時的变化を図2に示す。実施例2及び実施例3から、水中で糖質と脂質を加熱して糖含有脂質を製造する場合、乳化剤を添加した方が収量が多いことが判る。

【0019】

【実施例4】マルトース20mg、ホスファチジルエタノールアミン5mg及び乳化剤としてショ糖脂肪酸エステル(DKエステルF-90、第一工業製薬製)0.5mgを水5ml中で混合し、超音波処理して安定な分散液を得た後、この分散液を100°Cで9時間加熱した。加熱後、分散液にクロロホルム：メタノール(1:1)混合液5mlを加えて脂質画分を抽出し、濃縮乾固した。そして、クロロホルム：メタノール：水(65:40:8)を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー(順相)を行ったところ、ホスファチジルエタノールアミンよりも移動度の低い位置にDittmer-Lester試薬及びオルシノール試薬で陽性反応を同時に示す物質の存在が確認された。従って、この物質をラクトース含有リン脂質と判断した。

【0020】

【実施例5】マルトース20mg、ホスファチジルセリン5mg及び乳化剤としてショ糖脂肪酸エステル(DKエステルF-90、第一工業製薬製)0.5mgを水5ml中で混合し、超音波処理して安定な分散液を得た後、この分散液を100°Cで9時間加熱した。加熱後、分散液にクロロホルム：メタノール(1:1)混合液5mlを加えて脂質画分を抽出し、濃縮乾固した。そして、クロロホルム：メタノール：水(65:40:8)を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー(順相)を行ったところ、ホスファチジルセリンよりも移動度の低い位置にDittmer-Lester試薬及びオルシノール試薬で陽性反応を同時に示す物質の存在が確認された。従って、この物質をマルトース含有リン脂質と判断した。

【0021】

【比較例2】マルトース20mg、ホスファチジルコリン5mg及び乳化剤としてショ糖脂肪酸エステル(DKエステルF-90、第一工業製薬製)0.5mgを水5ml中で混合し、超音波処理して安定な分散液を得た後、この分散液を100°Cで9時間加熱した。加熱後、分散液にクロロホルム：メタノール(1:1)混合液5mlを加えて脂質画分を抽出し、濃縮乾固した。そして、クロロホルム：メタノール：水(65:40:8)を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー(順相)を行ったところ、Dittmer-Lester試薬及びオルシノール試薬で陽性反応を同時に示す物質の存在は確認されなかった。実施例1～5及び比較例1～2から、原料として使用する脂質としては、分子内に第一級アミンを持つリソスフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リボホスファチジルセリンなどのリン脂質が好ましく、分子内に第一級アミンを持たないスフィンゴミエリンやホスファチジルコリンなどのリン脂質は好ましくないことが判る。

【0022】

【実施例6】マルトース20mg、ホスファチジルエタノールアミン5mg及び乳化剤としてショ糖脂肪酸エステル(DKエステルF-90、第一工業製薬製)0.5mgをリン酸、酢酸及びホウ酸混合液—水酸化ナトリウムからなるBritton-Robinsonの広域緩衝液(pH3～8)5ml中で混合し、超音波処理して安定な分散液を得た後、この分散液を100°Cで9時間加熱した。加熱後、分散液にクロロホルム：メタノール(1:1)混合液5mlを加えて脂質画分を抽出し、濃縮乾固した。そして、クロロホルム：メタノール：水(65:40:8)を溶出溶媒としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりマルトース含有リン脂質を回収し、pHの違いによるマルトース含有リン脂質の生成率を調べた。その結果を図3に示す。この結果、マルトース含有リン脂質はpH4.5～7.5で高い生成率を

示した。

【0023】

【実施例7】牛乳由来のリン脂質濃縮物1g、ガラクトース4g及び乳化剤としてソルビタンモノラウレート0.5gを酢酸緩衝液(pH6)2リットル中で混合した後、80°Cで11時間加熱した。加熱後、分散液にクロロホルム：メタノール(1:1)混合液2リットルを加えて脂質画分を抽出し、濃縮乾固した。そして、クロロホルム：メタノール：水(65:40:8)を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー(順相)を行ったところ、ガラクトース含有リン脂質の生成が確認できた。なお、Dittmer-Lester発色デンシティメトリ法により定量したところ、ガラクトース含有リン脂質を含む脂質混合物0.4gが生成していることが判った。

【0024】

【実施例8】マルトース20mg、ホスファチジルエタノールアミン5mg及び乳化剤0.5mgを水5ml中で混合し、超音波処理して安定な分散液を得た後、この分散液を100°Cで10時間加熱した。なお、乳化剤としては、エステル化度の異なるショ糖脂肪酸エステル(DKエステルF-160、F-90、F-70、第一工業製薬製)を使用した。加熱後、分散液にクロロホルム：メタノール(1:1)混合液5mlを加えて脂質画分を抽出し、濃縮乾固した。そして、クロロホルム：メタノール：水(65:40:8)を溶出溶媒としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりマルトース含有リン脂質を回収し、エステル化度の違いによるマルトース含有リン脂質の生成率を調べた。その結果を表1に示す。ショ糖脂肪酸エステルのエステル化度が違っても、反応効率は大きく変わらないことが判る。したがって、親水性度の高い乳化剤であれば全て使用が可能である。

【0025】

【表1】

乳化剤の種類	エステル化度	生成率(%)
F-160	1.21	82.0
F-90	1.53	81.6
F-70	1.60	81.1

【0026】

【発明の効果】本発明によると、糖質と脂質を加熱することにより、容易に糖含有脂質を製造することができる。このようにして製造された糖含有脂質は、両親媒的な性質を有するので、界面活性剤や乳化剤などの食品添加物や医薬、化粧品素材として有用である。

【図面の簡単な説明】

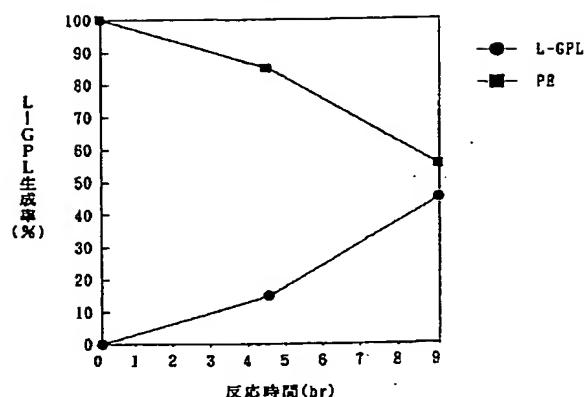
【図1】実施例2におけるマルトース含有リン脂質の生成量の経時的变化を示す。図中、PEはホスファチジルエ

タノールアミンを、L-GPLはマルトース含有リン脂質を示す。

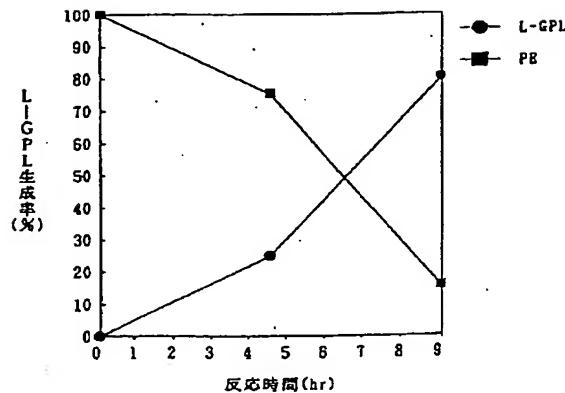
【図2】実施例3におけるマルトース含有リン脂質の生成量の経時的变化を示す。図中、PEはホスファチジルエタノールアミンを、L-GPLはマルトース含有リン脂質を示す。

【図3】実施例6におけるpHの違いによるマルトース含有リン脂質の生成率を示す。

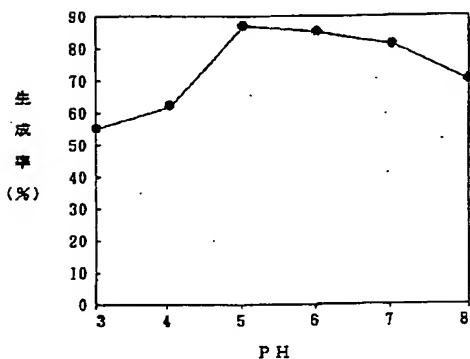
【図1】



【図2】



【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成7年12月15日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正内容】

【0019】

【実施例4】ラクトース20mg、ホスファチジルエタノールアミン5mg及び乳化剤としてショ糖脂肪酸エステル(DKエステルF-90、第一工業製薬製)0.5mgを水5ml中で混合し、超音波処理して安定な分散

液を得た後、この分散液を100°Cで9時間加熱した。加熱後、分散液にクロロホルム：メタノール(1:1)混合液5mlを加えて脂質画分を抽出し、濃縮乾固した。そして、クロロホルム：メタノール：水(65:40:8)を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー(順相)を行ったところ、ホスファチジルエタノールアミンよりも移動度の低い位置にDittmer-Lester試薬及びオルシノール試薬で陽性反応を同時に示す物質の存在が確認された。従って、この物質をラクトース含有リン脂質と判断した。